



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-61642  
(P2003-61642A)

(43) 公開日 平成15年3月4日 (2003.3.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 M 3/00		C 1 2 M 3/00	Z 4 B 0 2 9
1/36		1/36	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2001-261556 (P2001-261556)  
(22) 出願日 平成13年8月30日 (2001.8.30)

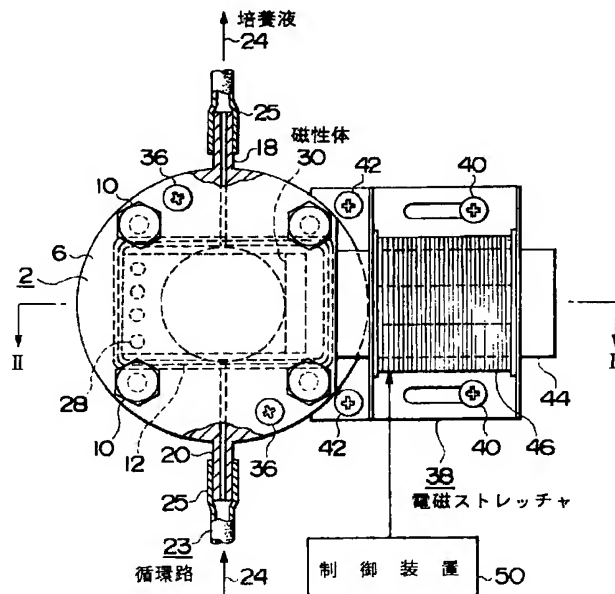
(71) 出願人 000170130  
高木産業株式会社  
静岡県富士市西柏原新田201番地  
(72) 発明者 高木 多佳雄  
静岡県富士市西柏原新田201番地 高木産業株式会社内  
(72) 発明者 渡辺 節雄  
静岡県富士市西柏原新田201番地 高木産業株式会社内  
(74) 代理人 100083725  
弁理士 畝本 正一  
Fターム (参考) 4B029 AA02 AA11 BB11 CC08 DF10

(54) 【発明の名称】 細胞・組織培養装置

(57) 【要約】

【課題】 所望の引っ張り応力を物理的刺激として細胞や組織等の被培養物に付与し、その培養促進を図ることができる細胞・組織培養装置を提供する。

【解決手段】 培養液 (24) を循環させるチャンバ (培養チャンバ8)、チャンバに設置されて培養される被培養物 (マトリクス32)、被培養物にチャンバの外から引っ張り応力を作用させる応力発生手段 (電磁ストレッチャ38、アクチュエータ56)、この応力発生手段に発生する引っ張り応力の断続、漸増又は漸減させる制御手段 (制御装置50、60) 等を備える。引っ張り応力の印加とその解除により伸縮させて被培養物に増殖に必要な物理的刺激を付与することができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 培養液を循環させるチャンバと、  
このチャンバに設置されて培養される被培養物と、  
この被培養物に前記チャンバの外から引っ張り応力を作用させる応力発生手段と、  
この応力発生手段に発生する前記引っ張り応力を断続、  
前記引っ張り応力の大きさを漸増又は漸減させる制御手段と、  
を備え、前記被培養物に加えられる引っ張り応力を断続  
させるとともに、その応力を時間の経過とともに漸増又  
は漸減させることを可能にしたことを特徴とする細胞・  
組織培養装置。

【請求項2】 培養液を循環させるチャンバと、  
このチャンバに被培養物とともに設置される伸縮性部材と、  
この伸縮性部材を介して前記被培養物に前記チャンバの  
外から引っ張り応力を作用させる応力発生手段と、  
この応力発生手段に発生する前記引っ張り応力を断続、  
前記引っ張り応力の大きさを漸増又は漸減させる制御手段と、  
を備え、前記被培養物に加えられる引っ張り応力を断続  
させるとともに、その応力を時間の経過とともに漸増又  
は漸減させることを可能にしたことを特徴とする細胞・  
組織培養装置。

【請求項3】 前記応力発生手段は、前記被培養物又は  
前記伸縮性部材に取り付けた磁性体に磁力を作用させる  
電磁力発生装置で構成したことを特徴とする請求項1 又は  
2 記載の細胞・組織培養装置。

【請求項4】 前記伸縮性部材にシリコンラバーシート  
を用いていることを特徴とする請求項2 記載の細胞・組  
織培養装置。

【請求項5】 前記チャンバが形成された培養ユニット  
が前記培養液を循環させる培養回路に着脱可能であるこ  
とを特徴とする請求項1 又は2 記載の細胞・組織培養装  
置。

【請求項6】 前記チャンバが形成された前記培養ユニ  
ットの一部分又は全部を透明化するとともに、撮影手段を  
備えることにより、前記チャンバ内の前記被培養物を前  
記チャンバ外から撮影可能にしたことを特徴とする請求  
項1 又は2 記載の細胞・組織培養装置。

【請求項7】 前記被培養物は、シート状、筒状又は柱  
状に形成されていることを特徴とする請求項1 記載の細胞  
・組織培養装置。

【請求項8】 前記被培養物は、繊維状又は紐状の組織  
体を編み込んで伸縮性を備えたことを特徴とする請求項  
1 記載の細胞・組織培養装置

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ティッシュエンジ  
ニアリング（組織工学）に応用した細胞、組織培養等に

用いられる細胞・組織培養装置に係り、より詳細に述べ  
れば、人体等の生体の細胞、組織を体外培養する際に細胞  
や組織の代謝機能を効率的に発現させ、細胞の延命、  
分化、促進に必要な物理的刺激を被培養物に付与する細胞  
・組織培養装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、人体等の生体の細胞、組織を体外  
培養する方法には、インキュベータ（培養庫）内の温度、  
湿度、二酸化炭素濃度、酸素濃度を適切な条件に維持し、  
その中で細胞を培養するという方法が取られている。細胞、  
組織は培養液中に浮遊状態に置かれるか、その培養液成分  
の入ったゲルの中又は表面に固定して増殖、成長させるか、  
マトリクス又はスキャホールド、足場、担体、鋳型等と  
呼ばれる物質（以下単に「マトリクス」と称する）内に細胞、  
組織を植え付けて増殖、成長させている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、細胞、組織  
の増殖、成長には、温度、湿度、二酸化炭素濃度、酸素  
濃度等の環境条件に加え、培養すべき細胞、組織に物理  
的刺激を与えることが重要である。このような物理的刺激  
は細胞や組織の分化及び成長を促進させるとともに、  
より生体内の細胞や組織に近い細胞や組織に成長させる  
ために不可欠な要素である。細胞、組織の増殖、成長に  
物理的刺激を付与する技術として、例えば、特許第3163533  
号「シリコンベルトを使った培養細胞用伸縮刺激負荷装置」  
がある。

【0004】そして、細胞、組織の増殖、成長には、温度、  
湿度、二酸化炭素濃度、酸素濃度等の培養環境という静的  
条件に、物理的刺激という動的条件を加重することが必要  
であるが、静的条件とともに動的条件を制御することは、  
制御形態が複雑化するとともに、雑菌の侵入等の原因要素  
を増加させるおそれがある。雑菌汚染から被培養物を防  
護することは重要な課題である。

【0005】そこで、本発明は、所望の引っ張り応力を物  
理的刺激として細胞や組織等の被培養物に付与し、その培  
養促進を図ることができる細胞・組織培養装置を提供する  
ことを課題とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明の細胞・組織培養  
装置は、培養液（24）を循環させるチャンバ（培養チャン  
バ8）と、このチャンバに設置されて培養される被培養物  
（マトリクス32、培養体32A、32B）と、この被培養物に  
前記チャンバの外から引っ張り応力を作用させる応力発生  
手段（電磁ストレッチャ38、アクチュエータ56）と、こ  
の応力発生手段に発生する前記引っ張り応力を断続、前記  
引っ張り応力の大きさを漸増又は漸減させる制御手段（制  
御装置50、60）とを備え、前記被培養物に加えられる  
引っ張り応力を断続させるとともに、その応力を時間の経  
過とともに漸増又は漸減させることを特徴とする細胞・組  
織培養装置。

減させることを可能にしたことを特徴とする。

【0007】即ち、チャンバ内に設置された被培養物には、応力発生手段に発生させた引っ張り応力がチャンバ外から加えられる。そして、その応力の形態は制御手段で断続、漸増又は漸減状態に制御される。この結果、被培養物は、引っ張り応力の印加時に伸び、引っ張り応力の解除時に縮むことにより伸縮する。例えば、チャンバ内に被培養物の一端側を固定し、その他端側に張力を不連続に作用させることにより被培養物を伸縮させることができ、この伸縮及びその張力の大きさ、断続等に応じた引っ張り応力が被培養物に付与され、その結果、被培養物には増殖に必要な物理的刺激が付与されるので、靱帯等の強靱な組織を培養創成することができる。この場合、引っ張り応力の発生手段には、シリンダ装置等の機械力の発生手段を用いることができる。

【0008】本発明の細胞・組織培養装置は、培養液(24)を循環させるチャンバ(培養チャンバ8)と、このチャンバに被培養物(マトリクス32、培養体32A、32B)とともに設置される伸縮性部材(培養シート22)と、この伸縮性部材を介して前記被培養物に前記チャンバの外から引っ張り応力を作用させる応力発生手段(電磁ストレッチャ38、アクチュエータ56)と、この応力発生手段に発生する前記引っ張り応力を断続、前記引っ張り応力の大きさを漸増又は漸減させる制御手段(制御装置50、60)とを備え、前記被培養物に加えられる引っ張り応力を断続させるとともに、その応力を時間の経過とともに漸増又は漸減させることを可能にしたことを特徴とする。

【0009】ところで、被培養物に直接的に張力を作用させることは、被培養物の成長を十分に配慮し、損傷や断裂を防止することが重要である。そこで、被培養物を伸縮性部材に付着させれば、被培養物は伸縮性部材によって防護され、伸縮性部材とともに伸縮が可能となる。このような伸縮性部材に対し、応力発生手段が発生した応力を加えて伸縮させると、被培養物にはその伸縮に応じた引っ張り応力を作用させることができる。この引っ張り応力を作用させて被培養物を培養すれば、絶えず引っ張り応力を受けている腱や靱帯等の細胞や組織を実現することができる。例えば、チャンバ内に被培養物を植え付けた伸縮性部材の一端側を固定し、その他端側に張力を不連続に作用させることにより伸縮させることができ、この伸縮及びその張力の大きさ、断続等に応じた引っ張り応力を被培養物に付与することができる。

【0010】本発明の細胞・組織培養装置において、前記応力発生手段(電磁ストレッチャ38)は、前記被培養物又は前記伸縮性部材に取り付けた磁性体(30)に磁力を作用させる電磁力発生装置で構成したことを特徴とする。即ち、被培養物又は伸縮性部材に取り付けた磁性体に電磁力を作用させれば、チャンバ内の被培養物にチャンバ外から必要な引っ張り応力を電磁力によって被

培養物又は伸縮性部材に付与することができる。この場合、チャンバの外部から被培養物に非接触かつ間接的に引っ張り応力を付与することができるので、雑菌等の汚染から被培養物を防護することができる。

【0011】本発明の細胞・組織培養装置において、前記伸縮性部材にシリコンラバーシートを用いていることを特徴とする。即ち、シリコンラバーシートは、被培養物に物理的刺激として引っ張り応力を付与するに必要な伸縮性を備えるとともに、被培養物を汚染することはない。

【0012】本発明の細胞・組織培養装置において、前記チャンバが形成された培養ユニット(2)が前記培養液を循環させる培養回路(循環路23)に着脱可能であることを特徴とする。即ち、被培養物を培養ユニットとともに移送することができるとともに、その密閉化が容易になるので、雑菌等の汚染から被培養物を防護することができる。

【0013】本発明の細胞・組織培養装置において、前記チャンバが形成された前記培養ユニットの一部又は全部を透明化するとともに、撮影手段(CCDカメラ52)を備えることにより、前記チャンバ内の前記被培養物を前記チャンバ外から撮影可能にしたことを特徴とする。即ち、培養中の被培養物を撮影することができ、チャンバ内の培養環境を乱すことなく、培養状態を容易に監視することができる。その撮影又は映像データは、被培養物の増殖や成長の重要な資料となる。

【0014】本発明の細胞・組織培養装置において、前記被培養物は、シート状、筒状又は柱状に形成されていることを特徴とする。即ち、靱帯等、修復すべき人体の部分に対応した形態としてシート状、筒状又は柱状に被培養物を培養する。

【0015】本発明の細胞・組織培養装置において、前記被培養物は、繊維状又は紐状の組織体を編み込んで伸縮性を備えたことを特徴とする。即ち、繊維状又は紐状の組織体、例えば、繊維状又は紐状に形成されたコラーゲンからなる組織体を編み込むことにより、増殖前の組織体に適当な伸縮性及び強靱性を保持させることができ、靱帯等の強靱な組織を培養することができる。

【0016】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を実施例を参照して詳細に説明する。

【0017】図1ないし図6は本発明の細胞・組織培養装置の第1実施例を示し、図1は培養ユニット及び駆動部の構成、図2は図1のII-II線断面、図3は培養ユニットの構成、図4は培養シート、図5は制御装置、図6は培養環境を示している。

【0018】この細胞・組織培養装置には、人等の生体の細胞や組織である被培養物を培養する培養空間を形成する培養ユニット2が設けられている。この培養ユニット2は、高耐熱性で生体に悪影響を及ぼすような物質が

溶出ししない樹脂材料や金属材料、例えば、弗素樹脂、PEEK、高耐熱グレードポリプロピレン、シリコン、ステンレススチール等で形成されている。

【0019】この培養ユニット2は容器部4と着脱可能な蓋部6とを備え、蓋部6で密閉された容器部4の内部には閉塞された培養空間として培養チャンバ8が形成されている。この実施例の場合、蓋部6は複数の固定ボルト10によって容器部4に着脱可能に固定されているとともに、容器部4と蓋部6との間には培養チャンバ8を包囲する矩形のリング12が介挿され、培養チャンバ8には十分な気密性が保持されている。容器部4は、内部の培養状態を確認可能とするため、透明部分を形成し又は透明部材で構成してもよい。

【0020】培養チャンバ8は、内側に円形部14、その開口側に矩形部16が形成され、円形部14側には容器部4の壁部に円形部14の直径方向に循環用ポート部18、20が形成され、矩形部16側には培養床である伸縮性部材としてシリコンラバーシート等からなる培養シート22が設置されている。循環用ポート部18、20には、培養回路である循環路23の循環チューブ25が連結され、循環路23を通じて供給される培養液24が培養チャンバ8内を循環するとともに溜められる。

【0021】培養シート22は、培養チャンバ8の矩形部16より狭く、短い矩形形状であって、その一端側には複数の透孔26が培養シート22の幅方向に一定の間隔で形成され、各透孔26には培養チャンバ8の矩形部16側に形成された固定手段である複数の係止突部28が挿入されている。この係止突部28と透孔26との係合によって培養シート22の一端が培養チャンバ8の内部に固定されている。この実施例では、係止突部28を円柱状に形成しているが、角柱状でもよい。そして、この培養シート22の他端、即ち、その自由端側には角柱状の磁性体30が取り付けられ、図4に示すように、培養シート22の表面には、磁性体30と透孔26との間にコラーゲンスポンジ等で形成されたマトリクス32が取り付けられている。このマトリクス32は被培養物である、例えば、人の培養すべき幹細胞、腱細胞、筋肉細胞等が蒔かれている。

【0022】そして、この培養ユニット2の容器部4と蓋部6とは一体化され、基盤34に固定ボルト36によって着脱可能に取り付けられている。また、基盤34には応力発生手段として電磁力によって応力を発生させる電磁ストレッチャ38が固定ボルト40によって取り付けられている。固定ボルト42は基盤34を図示しない基台に固定するための手段である。なお、基盤34は、容器部4の内部の培養状態を確認可能とするため、培養チャンバ8に対応して透明部分を形成し又は透明部材で構成してもよい。

【0023】電磁ストレッチャ38は、フェライト等で形成されたコア44にソレノイド46を巻回した電磁力

による応力発生手段であって、コア44の一端を培養チャンバ8内の磁性体30に対向させてある。この電磁ストレッチャ38のソレノイド46には駆動電流を流し、その解除等を行う制御手段として制御装置50が接続されている。

【0024】このように構成すれば、ソレノイド46を励磁し、コア44を通して電磁力を磁性体30に作用させると、磁性体30がコア44側に引き付けられ、培養シート22とともにコラーゲンスポンジ内で増殖している細胞や組織であるマトリクス32を引き伸ばすように張力を作用させることができる。その電磁力を解除すると、培養シート22はその伸縮性により縮む。この結果、マトリクス32に培養シート22の伸縮による引っ張り応力及びその復帰力を作用させることができる。このとき、循環路23を通じて培養に必要な培養液24の送液、循環が行われ、細胞又は組織の増殖が促進される。

【0025】そして、制御装置50には、例えば、図5に示すように、電磁ストレッチャ38のソレノイド46に駆動電流を流すとともにその制御を行う電流制御部500、この電流制御部500の制御の他、駆動制御、表示制御等を行う主制御部501が設けられ、張力パターン等を設定するためのプログラム制御が実行される。主制御部501には、処理手段としてのCPU、メモリとしてのROM及びRAM等が備えられ、外部に接続した入力装置502から回転条件等のプログラム設定が行われる。また、主制御部501には、表示部504、運転指令を付与する運転スイッチ506、運転表示手段として例えば、表示ランプ508、警報手段である警報ブザー510の他、各種データを記憶する手段として外部記憶装置512、データベース514等が設けられている。また、この制御装置50には異常動作を防止する安全装置516が設けられ、この安全装置516は、ソレノイド46に併設されてソレノイド46の温度上昇を検出する温度センサ518、ソレノイド46に流れる過大電流の検出手段として電流制御部500、これら温度上昇や過大電流の検出出力により異常動作を防止する主制御部501を以て構成されている。

【0026】また、この細胞・組織培養装置は、例えば、図6に示すように構成されて最適な培養環境を形成する培養庫550に收容される。循環路23には、培養液24を溜める培養液バッグ552、ガスを循環路23へ吸収させるガス吸収チューブ554、培養液24の循環を行うための送液装置556が設けられている。送液装置556には、ピストン駆動装置560で進退するピストン562が設けられており、ピストン562が進出したとき、弁564が開、弁566が閉、ピストン562が後退したとき、弁564が閉、弁566が開となり、所定量の培養液24の送出が行われる。

【0027】そして、培養庫550は、加熱手段として

ヒータ572、送風手段としてファン574、所望の湿度を設定する手段として加湿装置576、温度センサ578を備えるとともに、N<sub>2</sub>供給装置580からN<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>供給装置582からO<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>供給装置584からCO<sub>2</sub>が供給され、細胞や組織の増殖及び成長に最適な培養環境が形成されている。

【0028】次に、第1実施例の細胞・組織培養装置を用いた培養処理を図7及び図8に示すフローチャートを参照して説明する。図7及び図8において、A、Bはフローチャート間の連結子を示している。

【0029】実際の培養に当たっては、細胞や組織を植え付けたマトリクス32を蓋部6を外して培養チャンバ8に収容した後、培養庫550に設置する。培養庫550内の温度、湿度、二酸化炭素濃度、酸素濃度等を適切な条件に設定した後、マトリクス32に対して細胞、組織に最適な流量の培養液24を供給する。

【0030】ステップS1では制御装置50を動作状態に設定し、入力装置502を通して運転プログラムの入力を行うとともに、条件設定を行う。例えば、入力項目は、培養段階等を想定し、第1段階～第3段階が設定され、第1段階では物理的刺激、即ち、引っ張り応力のレベルをS<sub>1</sub>、その継続時間をT<sub>1</sub>、第2段階では引っ張り応力のレベルをS<sub>2</sub>、その継続時間をT<sub>2</sub>、第3段階では引っ張り応力のレベルをS<sub>3</sub>、その継続時間をT<sub>3</sub>とすれば、これらの大小関係は、S<sub>1</sub> < S<sub>2</sub> < S<sub>3</sub>、T<sub>1</sub> < T<sub>2</sub> < T<sub>3</sub>とする。この条件は一例であり、種々の条件を設定することができる。

【0031】このような条件設定の後、ステップS2で運転スイッチ506が投入されると、ステップS3に移行し、表示部504には運転表示が行われるとともに、表示ランプ508が点灯する。

【0032】そして、ステップS4では、培養シート22にレベルS<sub>1</sub>の引っ張り応力を作用させるため、ソレノイド46にレベルS<sub>1</sub>に相当する電流を加え、ステップS5に移行する。ステップS5では、引っ張り応力の精度を維持するため、安全装置516に異常が生じているか否かを判定する。この場合、ソレノイド46に流れる検出電流の値が異常レベルか否か、ソレノイド46の検出温度が異常温度か否かを判定し、異常がない場合にはステップS6に移行する。ステップS6では、時間T<sub>1</sub>が経過したか否かが判定され、継続時間T<sub>1</sub>が経過するまで、ステップS4、S5の処理が行われる。

【0033】時間T<sub>1</sub>が経過すると、ステップS7に移行し、ソレノイド46にレベルS<sub>2</sub>に相当する電流が印加され、ステップS8に移行する。ステップS8では、安全装置516に異常があるか否かを判定し、異常がない場合にはステップS9に移行する。ステップS9では、時間T<sub>2</sub>が経過したか否かが判定され、継続時間T<sub>2</sub>が経過するまで、ステップS7、S8の処理が行われる。

【0034】時間T<sub>2</sub>が経過すると、ステップS10に移行し、ソレノイド46にレベルS<sub>3</sub>に相当する電流が印加され、ステップS11に移行する。ステップS11では、安全装置516に異常があるか否かを判定し、異常がない場合にはステップS12に移行する。ステップS12では、時間T<sub>3</sub>が経過したか否かが判定され、継続時間T<sub>3</sub>が経過するまで、ステップS10、S11の処理が行われる。

【0035】時間T<sub>3</sub>が経過すると、ステップS13に移行して終了表示が行われた後、ステップS14に移行し、運転スイッチ506がOFFになったか否かを判定し、OFFに移行するまで、ステップS10～S13の処理が行われる。

【0036】運転スイッチ506がOFFになると、ステップS15に移行し、ソレノイド46の励磁停止、運転表示及び終了表示の解除が行われ、培養プログラムが完了する。

【0037】また、ステップS5、ステップS8又はステップS11で安全装置516に異常が判明した場合には、ステップS16に移行し、ソレノイド46への電流供給を停止するとともに、ステップS17に移行し、表示部504に警告表示を表示するとともに、警報ブザー510を鳴動させ、異常を告知する。

【0038】次に、図9ないし図14は本発明の細胞・組織培養装置の第2実施例を示し、図9は培養ユニット及び駆動部の構成、図10は図9のX-X線断面、図11は図9のXI-XI線断面、図12は培養シート、図13は培養ユニット、図14は制御装置の構成を示し、第1実施例と同一部分には同一符号を付してある。

【0039】この実施例の細胞・組織培養装置は、第1実施例のソレノイド46に代えて培養チャンバ8の外部から直接応力を培養シート22及びマトリクス32に作用させるようにしたものである。この場合、培養ユニット2の側壁側に形成した透孔51から培養シート22に取り付けられたテンションスピンドル52を引き出し、このテンションスピンドル52の一端に張力制御用バネ54を介して応力発生手段であるアクチュエータ56の駆動軸58が取り付けられている。アクチュエータ56には、駆動軸58の進退を制御する制御手段として制御装置60が接続されている。

【0040】培養シート22の自由端側には、図12に示すように、固定手段としてチャック62が取り付けられて培養シート22が板状に保持され、チャック62の背面側にはテンションスピンドル52が取り付けられ、このテンションスピンドル52には張力制御用バネ54を取り付けるための透孔64が形成されている。

【0041】そして、培養ユニット2の容器部4の側壁部に形成された透孔51には、テンションスピンドル52と培養ユニット2との気密性保持手段としてのOリング66が取り付けられ、このOリング66を培養ユニット

2側に保持する手段として閉塞板68が培養ユニット2の側面部に取り付けられている。培養ユニット2は基台70に固定ボルト36によって着脱可能に取り付けられ、アクチュエータ56には、アクチュエータ56の駆動制御や増殖、成長の監視等を行う手段として制御装置60が設けられている。

【0042】この制御装置60は、例えば、図14に示すように構成されている。即ち、進退することにより培養シート22に引っ張り応力の印加及びその解除を行うシリンダ等のアクチュエータ56の駆動制御を行う他、表示制御等を行う主制御部600が設けられ、張力パターン等を設定するためのプログラム制御が実行される。主制御部600には、処理手段としてのCPU、メモリとしてのROM及びRAM等が備えられ、外部に接続した入力装置602から回転条件等のプログラム設定が行われる。また、主制御部600には、表示部604、運転指令を付与する運転スイッチ606、運転表示手段として例えば、表示ランプ608、警報手段である警報ブザー610の他、各種データを記憶する手段として外部記憶装置612、データベース614等が設けられている。また、アクチュエータ56には、その異常動作を防止する安全装置616が併設されている。

【0043】この第2実施例において、アクチュエータ56を駆動してテンションスピンドル52に張力を作用させると、培養シート22とともにコラーゲンスポンジ内で増殖している細胞や組織であるマトリクス32を引き伸ばすように張力を作用させることができ、その駆動を解除すると、培養シート22はその伸縮性により縮む結果、マトリクス32に培養シート22の伸縮による引っ張り応力及びその復帰力を作用させることができる。そして、循環路23を通じて培養に必要な培養液24の送液、循環が行われ、第1実施例と同様に細胞又は組織の増殖が促進される。

【0044】次に、第2実施例の細胞・組織培養装置を用いた培養処理を図15及び図16に示すフローチャート及び図17に示すタイミングチャートを参照して説明する。図15及び図16において、C及びDはフローチャート間の連結子を示している。

【0045】第2実施例においても、実際の培養に当たっては、細胞や組織を植え付けたマトリクス32を蓋部6を外して培養チャンバ8に収容した後、培養庫550に設置する。培養庫550内の温度、湿度、二酸化酸素濃度、酸素濃度等を適切な条件に設定した後、マトリクス32に対して細胞、組織に最適な流量の培養液24を供給することは第1実施例と同様である。

【0046】ステップS21では制御装置60を動作状態に設定し、入力装置602を通して運転プログラムの入力を行うとともに、条件設定を行う。例えば、入力項目は、培養段階等を想定し、第1段階～第3段階が設定され、第1段階は継続時間 $T_1$ とし、物理的刺激、即

ち、張力 $F_1$ （この実施例では $F_1 = 0$ ）、第2段階は継続時間 $T_2$ とし、張力 $F_2$ 、負荷時間 $t_{A2}$ 、無負荷時間 $t_{S2}$ 、第3段階は継続時間 $T_3$ とし、張力 $F_3$ 、負荷時間 $t_{A3}$ 、無負荷時間 $t_{S3}$ が設定されている。これらの大小関係は、 $F_1 (= 0) < F_2 < F_3$ 、 $T_1 < T_2 < T_3$ としているが、この条件は一例であり、種々の条件を設定することができる。

【0047】このような条件設定の後、ステップS22で運転スイッチ606が投入されると、ステップS23に移行し、表示部604には、図17の(A)に示すように、運転表示が行われるとともに、表示ランプ608が点灯する。

【0048】そして、ステップS24では時間 $T_1$ が経過したか否かを判定し、時間 $T_1$ が経過した後、ステップS25に移行し、安全装置616に異常が生じたか否かを判定し、異常がない場合にはステップS26に移行する。ステップS26では、張力 $F_2$ の相当分だけアクチュエータ56を移動する。

【0049】ステップS27では、この負荷時間 $t_{A2}$ が経過したか否かを判定する。即ち、負荷時間 $t_{A2}$ だけ張力 $F_2$ の印加を持続し、負荷時間 $t_{A2}$ が経過すると、ステップS28に移行し、アクチュエータ56を原点に復帰させた後、ステップS29に移行する。

【0050】ステップS29では、無負荷時間 $t_{S2}$ が経過したか否かを判定し、無負荷時間 $t_{S2}$ が経過したとき、ステップS30に移行する。ステップS30では、継続時間 $T_2$ が経過したか否かが判定され、継続時間 $T_2$ が経過するまで、ステップS25～S29の処理が図17の(C)に示すように継続的に行われる。

【0051】時間 $T_2$ が経過すると、ステップS31に移行し、安全装置616に異常が生じたか否かを判定し、異常がない場合にはステップS32に移行する。ステップS32では、張力 $F_3$ の相当分だけアクチュエータ56を移動し、ステップS33に移行する。

【0052】ステップS33では負荷時間 $t_{A3}$ が経過したか否かが判定され、負荷時間 $t_{A3}$ が経過するまで、張力 $F_3$ を作用させた状態を持続する。

【0053】負荷時間 $t_{A3}$ が経過すると、ステップS34に移行し、アクチュエータ56を原点に復帰させてステップS35に移行し、無負荷時間 $t_{S3}$ が経過したか否かを判定する。

【0054】無負荷時間 $t_{S3}$ が経過すると、ステップS36に移行し、ステップS36では、継続時間 $T_3$ が経過したか否かが判定され、継続時間 $T_3$ が経過するまで、ステップS31～S35の処理が図17の(C)に示すように継続的に行われる。

【0055】時間 $T_3$ が経過すると、ステップS37に移行して終了表示が行われた後、ステップS38に移行し、運転スイッチ606がオフになったか否かを判定し、オフに移行するまで、図17の(B)に示すよう



に、終了表示が点灯する。

【0056】運転スイッチ606がOFFになると、ステップS39に移行し、アクチュエータ56の駆動停止、逆転表示及び終了表示の解除が行われ、培養プログラムが完了する。

【0057】また、ステップS25又はステップS31で安全装置616に異常が判明した場合には、ステップS40に移行し、アクチュエータ56の駆動を停止するとともに、ステップS41に移行し、表示部604に異常が生じた旨の表示を行うとともに、警報ブザー610を鳴動させ、異常を告知する。

【0058】このような処理により、第1実施例と同様に、培養段階に応じて異なる張力による物理的刺激を被培養物に付与することができる。人体の筋肉、腱、関節の軟骨、骨、靱帯等は運動によって絶えず変化する物理的刺激を受けているが、第2実施例の細胞・組織培養装置を用いることにより、人体と同様の物理的刺激を実現し、強靱な細胞・組織を培養することができる。特に、第2実施例では、張力が加速及び減速によって変化しており、培養中の細胞・組織がパルスの刺激から緩やかな刺激まで幅広い物理的刺激を実現している。

【0059】次に、図18は、培養ユニット2の着脱を示している。第1実施例又は第2実施例で示した培養ユニット2を用いて培養が終了した後、培養ユニット2は、例えば、循環用ポート部18、20に接続されている循環路23の循環チューブ25を閉塞し、この実施例では、培養ユニット2を跨がって循環チューブ25に閉止手段としてピンチコック100及びコックバルブ102が取り付けられ、これらピンチコック100及びコックバルブ102の閉止処理を行えば、培養ユニット2を循環路23から分離できるとともに培養チャンバ8を密閉状態に保持でき、培養液24を漏洩させることがない。

【0060】また、培養ユニット2は、オートクレーブ等の殺菌方法や、紫外線殺菌、ガンマ線殺菌等で殺菌しておけば、内部は長期間にわたって無菌状態を維持することができる。この実施例では、循環チューブ25を閉止する手段としてピンチコック100、コックバルブ102を用いているが、他の閉止手段を用いてもよい。

【0061】次に、図19は、本発明の細胞・組織培養装置の第3実施例を示している。この実施例では、第1実施例の培養ユニット2の一部又は全部に培養チャンバ8内を透視できる透視壁部520が基盤34及び容器部4に設けられ、この透視壁部520の近傍に培養チャンバ8内のマトリクス32を撮影する撮影手段としてのC/Dカメラ522が設置され、このC/Dカメラ522で得られる映像が映像処理装置524に加えられて処理され、映像表示装置526に表示されるとともに、判定装置528に判定情報として加えられている。判定装置528では、その映像からマトリクス32の変色や形状

等により増殖、成長状態、雑菌増殖（コンタミネーション）の有無の判定が行われ、その判定結果が主制御部501に加えられている。即ち、培養チャンバ8内のマトリクス32の状況を映像情報として捉え、その映像情報を通じて観測すれば、マトリクス32の増殖、成長状況や成長段階を視覚を以て的確に把握でき、その状況に応じた的確な処置を取ることができる。このような培養ユニット2内の透視による監視は第2実施例の細胞・組織培養装置においても同様に適用できるものである。

【0062】次に、図20～図23は、被培養物の他の実施例を示している。第1実施例及び第2実施例では、培養シート22を用いて培養床としたが、図20の

(A)に示すように、マトリクス32に磁性体30を取り付けるとともに、固定用の透孔26を形成してもよく、また、図20の(B)に示すように、マトリクス32にチャック62及びテンションスピンドル52を取り付けてもよく、被培養物には必ずしも培養シート22を用いる必要はない。

【0063】また、図21の(A)に示すように、被培養物としてコラーゲン等からなる繊維状又は紐状の組織体をゴム編みやメリヤス編み等のように編み込んで形成した柔軟性のある培養体32Aを用いてもよい。この培養体32Aの固定端側には透孔26が形成され、その自由端側にはテンションスピンドル52を備えたチャック62が取り付けられており、同様に張力付与及び解除を行うようにしてもよい。このような培養シート22を用いない培養においても、図21の(B)に示すように、シート状の被培養物を実現することができる。また、チャック62及びテンションスピンドル52に代え、培養体32Aの自由端側に磁性体30を取り付け、第1実施例のように、この磁性体30に磁力を作用させて引っ張り応力を培養体32Aに付与するようにしてもよい。

【0064】また、図22の(A)及び(B)に示すように、被培養物としてコラーゲン等からなる繊維状又は紐状の組織体を平板状に編み込み、それを筒状又は柱状に巻き込んで形成した柔軟性のある培養体32Bを用いてもよい。この場合、その一端側を培養ユニット2の内壁部に突出した固定部72に固定し、その自由端側に磁性体30を取り付け、電磁ストレッチャ38を用いて張力付与とその解除を繰り返し、人体の運動量に対応した物理的刺激を付与すれば、筒状又は柱状の被培養物を得ることができる。また、このような筒状の培養体32Bを用いた場合、その中空部内にマトリクス32としてコラーゲンスポンジ等を充填してもよい。

【0065】また、被培養物としてコラーゲン等からなる繊維状又は紐状の組織体を平板状に編み込み、それを筒状又は柱状に巻き込んで形成した柔軟性のある培養体32Bを用いた場合、図23の(A)に示すように、その一端側を培養ユニット2の内壁部に突出した固定具74を用いて固定し、その自由端側にテンションスピンドル

ル52を取り付け、図9及び図10に示すように、アクチュエータ56を用いて培養体32Bに張力付与とその解除を繰り返し、人体の運動量に対応した物理的刺激を付与してもよく、このようにすれば、図23の(B)に示す筒状又は柱状の被培養物を得ることができる。そして、前記実施例と同様に、筒状の培養体32Bの中空部にマトリクス32としてコラーゲンスポンジ等を充填してもよい。

【0066】なお、第1実施例では、細胞・組織培養装置に図7及び図8に示すフローチャートによる制御を行う場合について説明したが、第1実施例の装置に図15～図17に示す制御を用いてもよく、第1実施例の装置において、例えば、第1段階は継続時間 $T_1$ とし、物理的刺激、即ち、張力 $F_1$ （この実施例では $F_1 = 0$ ）、第2段階は継続時間 $T_2$ とし、張力 $F_2$ 、負荷時間 $t_{A2}$ 、無負荷時間 $t_{S2}$ 、第3段階は継続時間 $T_3$ とし、張力 $F_3$ 、負荷時間 $t_{A3}$ 、無負荷時間 $t_{S3}$ に設定し、断続的に張力変化を付与するようにしても同様の効果が期待できる。

【0067】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、次の効果が得られる。

- a チャンバ内の被培養物に非接触で引っ張り応力等の物理的刺激を付与することができる。例えば、絶えず引っ張り応力を受けている腱や靱帯等の生体上の細胞や組織の培養を行うことができる。
- b 成長段階に応じた引っ張り応力等の物理的刺激を被培養物に付与することができる。
- c 被培養物を収容する培養ユニットを培養回路から独立して分離、着脱して移動させることができ、雑菌等の汚染から被培養物を防護することができる。
- d 被培養物に所望の物理的刺激を付与することができ、生体上の部位に対応した物理的刺激の実現とともに、培養促進を図ることができる。
- e 細胞や組織の成長段階を映像を以て的確に把握できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の細胞・組織培養装置の第1実施例を示す正面図である。

【図2】図1のII-II線断面図である。

【図3】培養ユニットの分解斜視図である。

【図4】培養シートを示す斜視図である。

【図5】制御装置を示すブロック図である。

【図6】培養庫に設置された培養ユニットを示す図である。

【図7】制御プログラムの前半部分を示すフローチャートである。

【図8】図7に示した制御プログラムの後半部分を示すフローチャートである。

【図9】本発明の細胞・組織培養装置の第2実施例を示す部分正面図である。

【図10】図9のX-X線断面図である。

【図11】図9のXI-XI線断面図である。

【図12】培養シートを示す斜視図である。

【図13】培養ユニットの分解斜視図である。

【図14】制御装置を示すブロック図である。

【図15】制御プログラムの前半部分を示すフローチャートである。

【図16】図15に示した制御プログラムの後半部分を示すフローチャートである。

【図17】運転表示、終了表示及びアクチュエータの動作を示すタイミングチャートである。

【図18】培養ユニットの着脱を示す断面図である。

【図19】本発明の細胞・組織培養装置の第3実施例を示すブロック図である。

【図20】被培養物の他の実施例を示す図である。

【図21】被培養物の他の実施例を示す図である。

【図22】被培養物の他の実施例を示す図である。

【図23】被培養物の他の実施例を示す図である。

【符号の説明】

2 培養ユニット

8 培養チャンバ

22 培養シート（伸縮性部材）

23 循環路（培養回路）

24 培養液

30 磁性体

32 マトリクス（被培養物）

32A、32B 培養体（被培養物）

38 電磁ストレッチャ（応力発生手段）

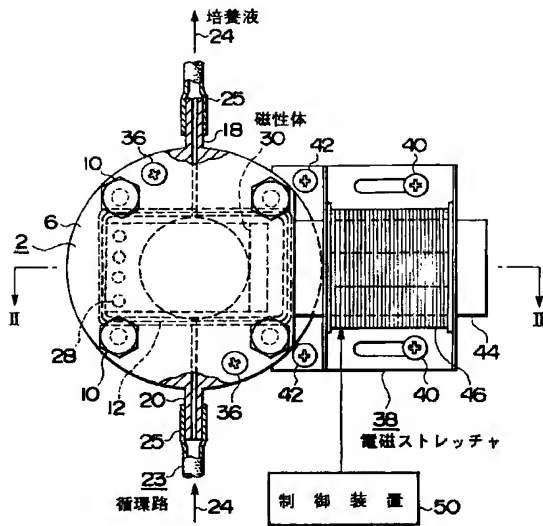
56 アクチュエータ（応力発生手段）

50、60 制御装置（制御手段）

522 CCDカメラ（撮影手段）

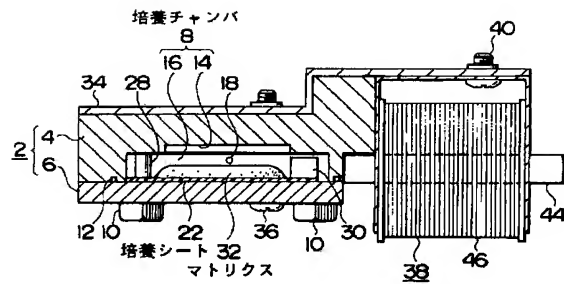


【図1】

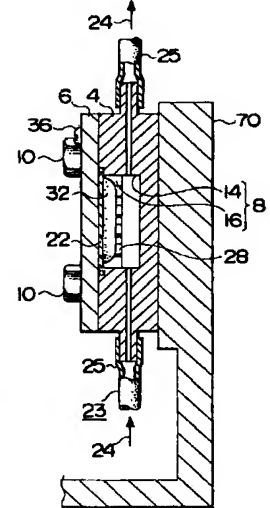


2: 培養ユニット

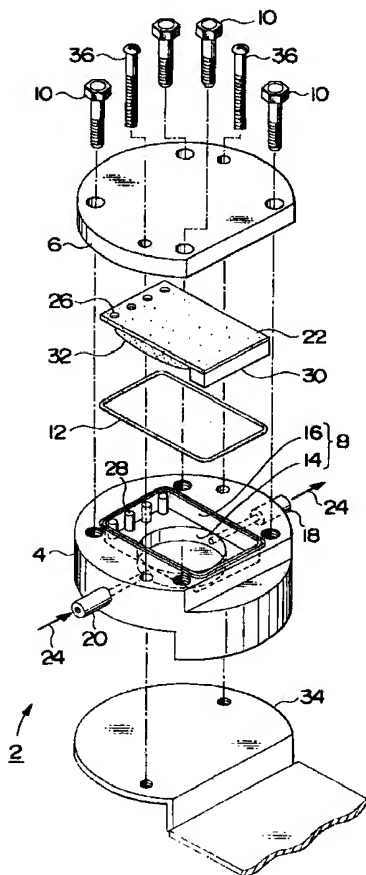
【図2】



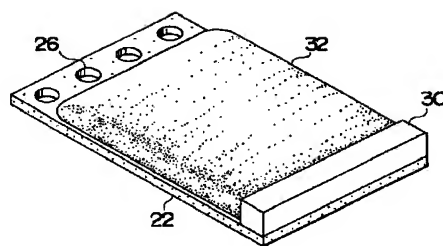
【図11】



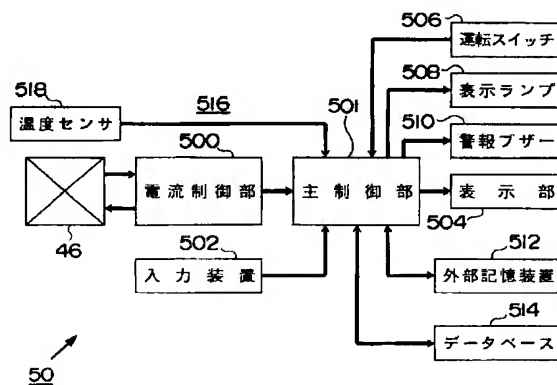
【図3】



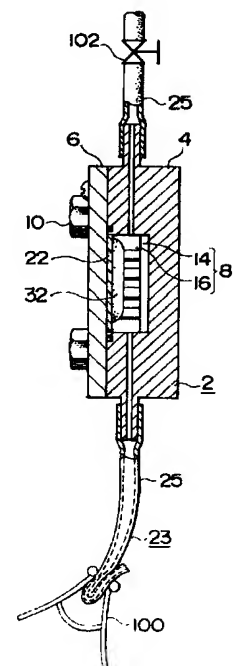
【図4】



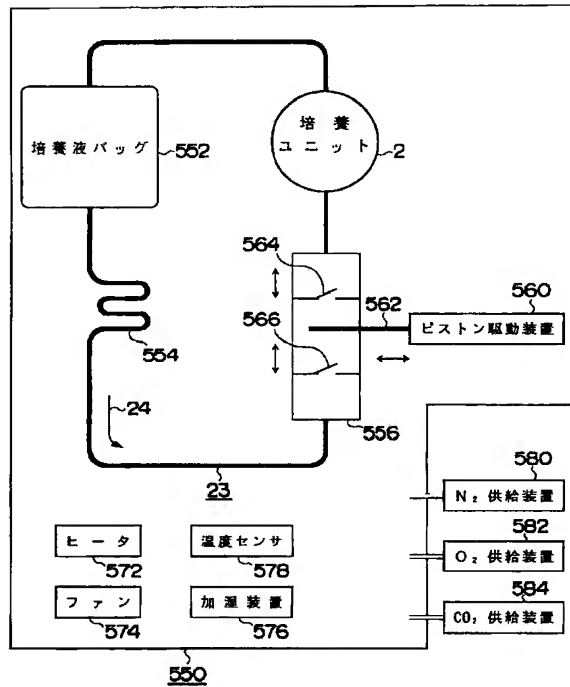
【図5】



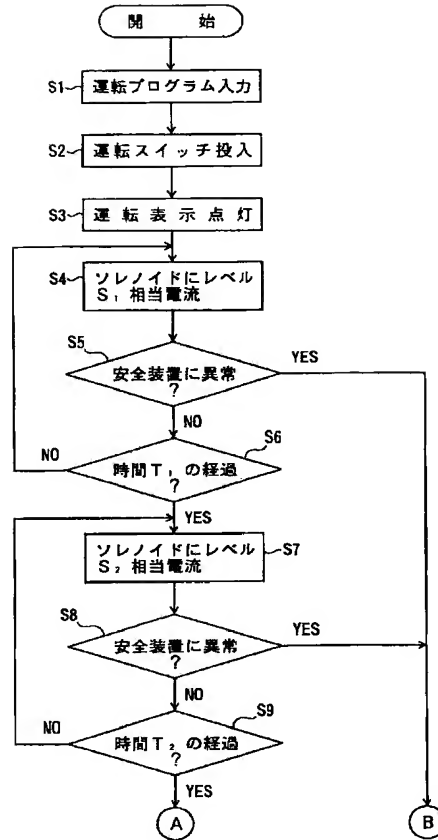
【図18】



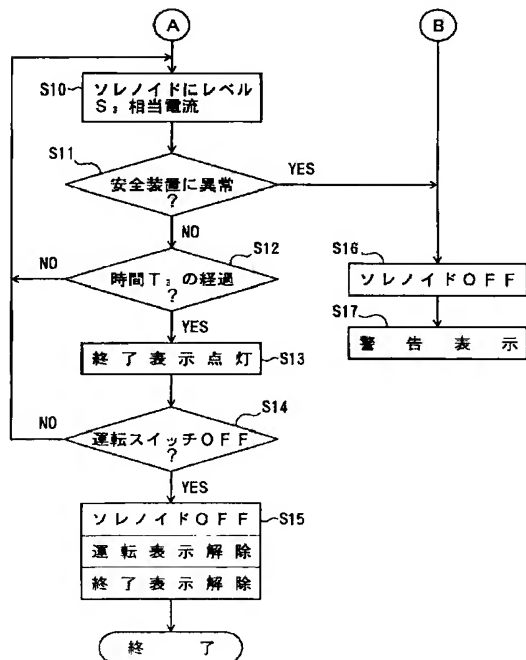
【図6】



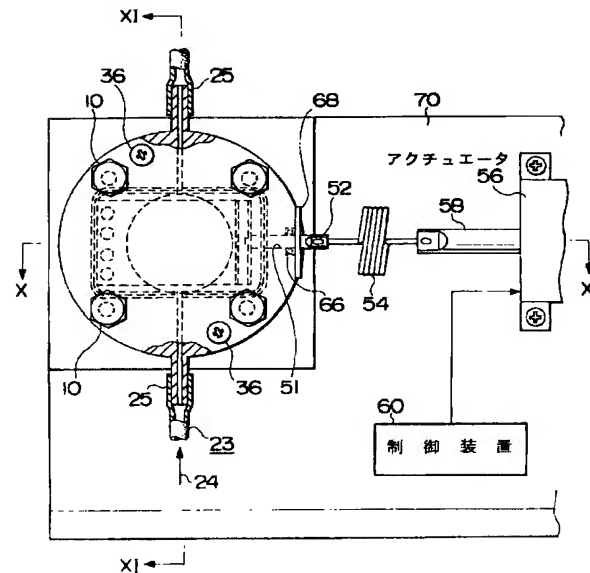
【図7】



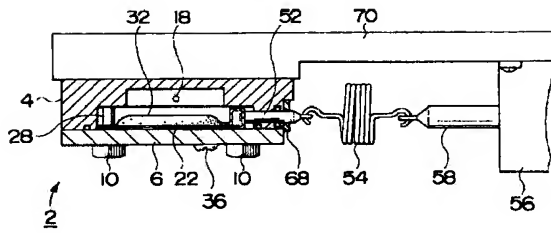
【図8】



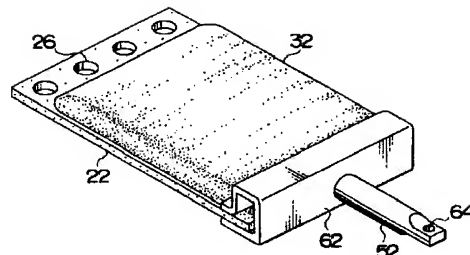
【図9】



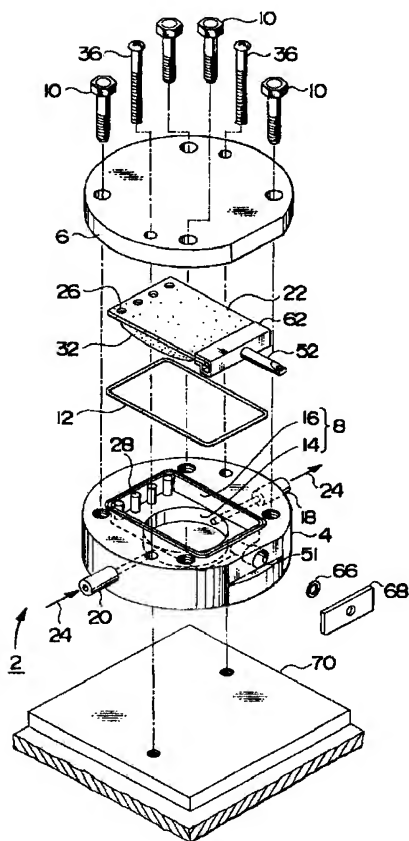
【図10】



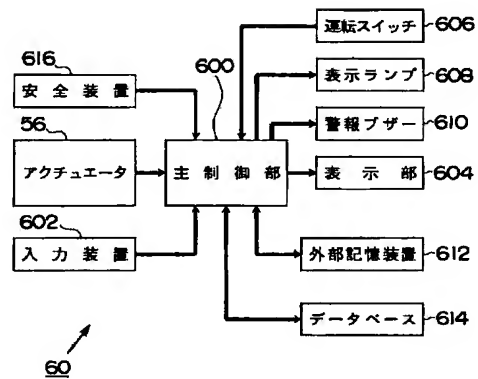
【図12】



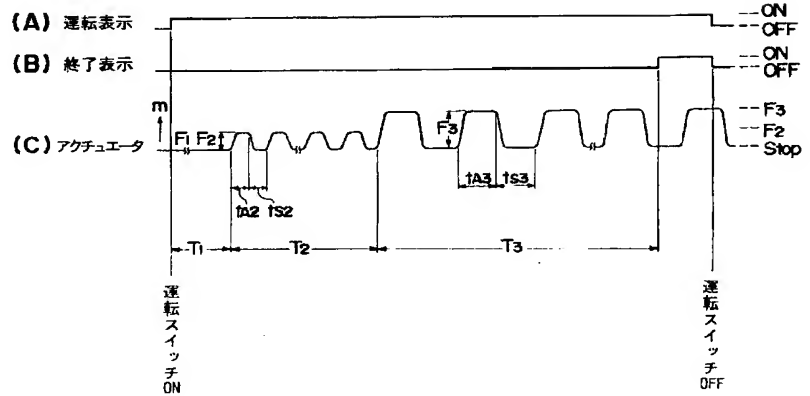
【図13】



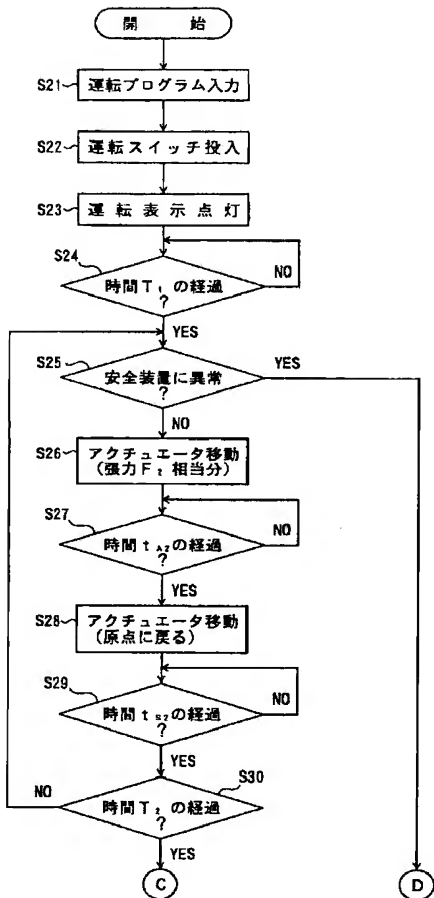
【図14】



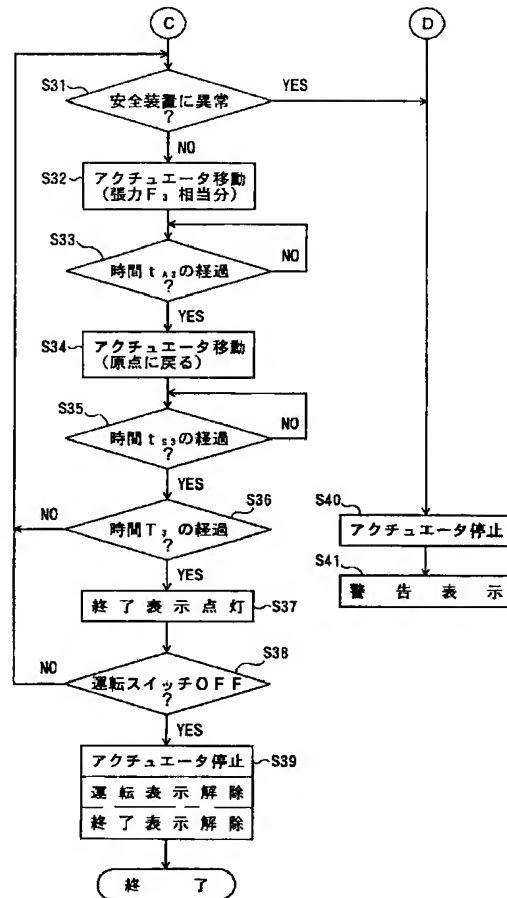
【図17】



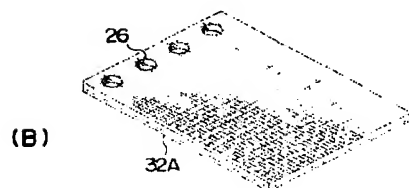
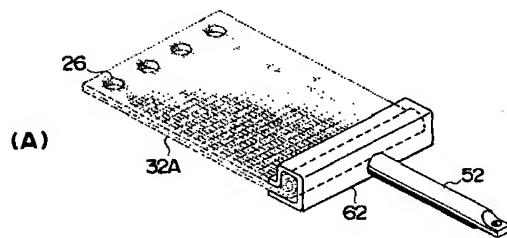
【図15】



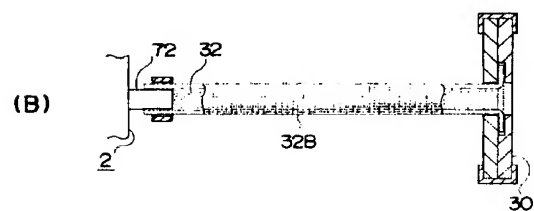
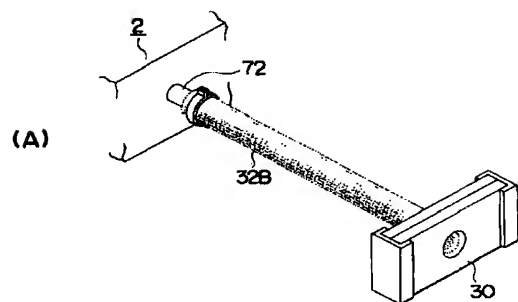
【図16】



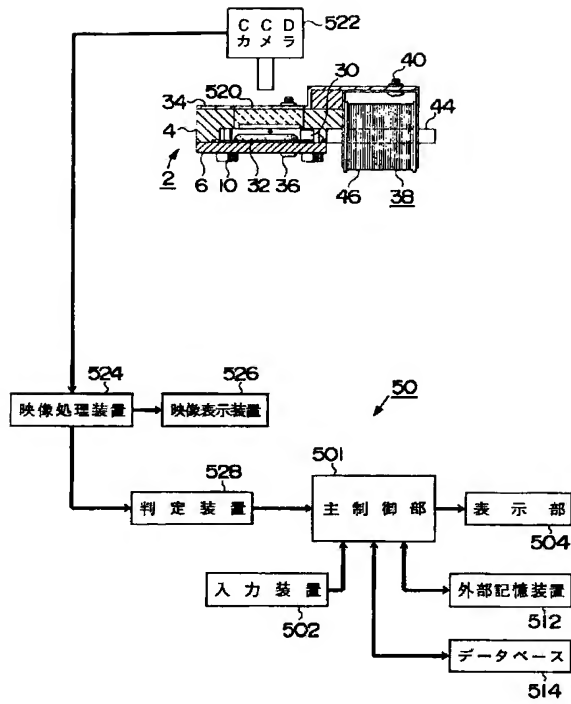
【図21】



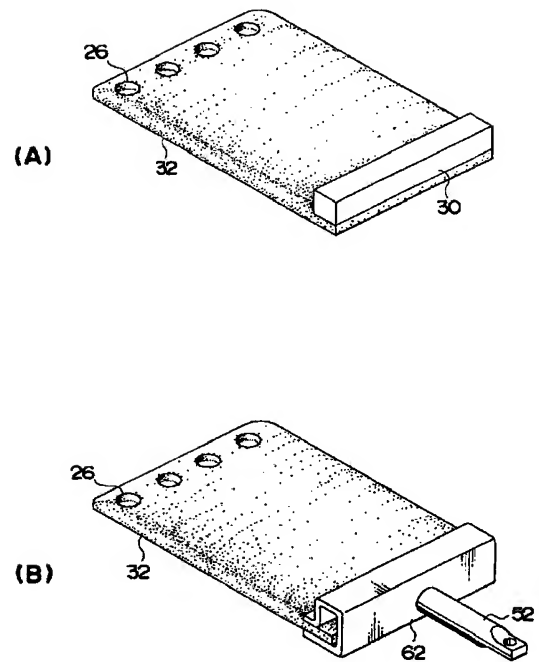
【図22】



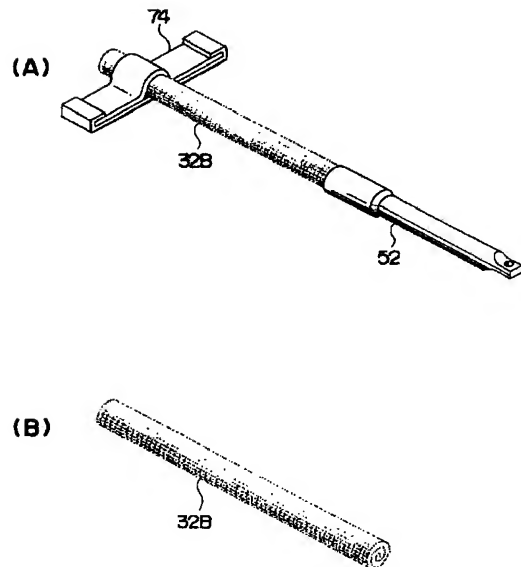
【図19】



【図20】



【図23】



# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-061642

(43)Date of publication of application : 04.03.2003

(51)Int.Cl. C12M 3/00

C12M 1/36

(21)Application number : 2001-261556

(71)Applicant : TAKAGI IND CO LTD

(22)Date of filing : 30.08.2001

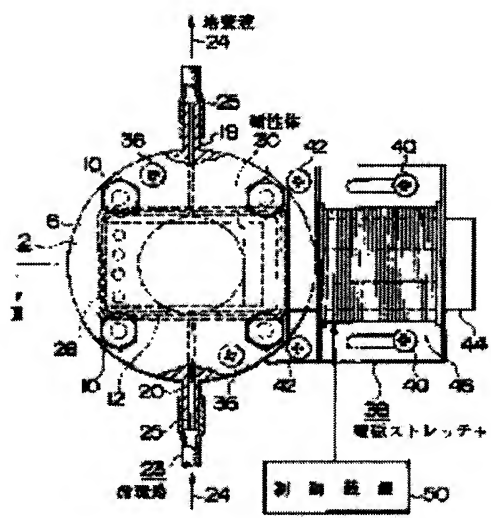
(72)Inventor : TAKAGI TAKAO  
WATANABE SETSUO

## (54) CELL AND TISSUE-CULTURING DEVICE

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a cell and tissue culturing device capable of imparting a desired tensile strength to the cultured cells or tissues as a physical stimulation for aiming at their growth acceleration.

**SOLUTION:** This cell and tissue culturing device is equipped with a chamber (a culturing chamber 8) for circulating a culturing liquid (24), a cultured material (a matrix 32) installed in the chamber and cultured, a stress-generation means (an electromagnetic stretcher 38, an actuator 56) effecting a tensile stress to the cultured material from the outside of the chamber, a controlling means (controlling devices 50, 60) for cutting on and off, and gradually increasing or gradually decreasing the tensile stress generated in the stress-generating means, etc. By extending and contracting with the addition and release of the stress, it is possible to impart the cultured material the physical stimulation necessary for its growth.



2 : 培養ユニット

## DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] If this invention relates to the cell and tissue culture equipment used for the cell adapting tissue engineering (systems engineering), tissue culture, etc. and it states to a detail more, in case it carries out explantation of the cell of living bodies, such as the body, and the organization, it makes a cell and the metabolism of an organization discover efficiently, and relates to



the cell and tissue culture equipment which gives physical irritation required for the prolongation of life of a cell, differentiation, and promotion to a culture-ed.

[0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, the temperature in an incubator (culture warehouse), humidity, carbon dioxide levels, and an oxygen density are maintained on suitable conditions, and the method of cultivating a cell in it is taken by the cell of living bodies, such as the body, and the approach of carrying out explantation of the organization. A cell and an organization plant a cell and an organization in the matter (a "matrix" is only called below) which fixes to the inside of the gel into which it was placed by the suspension condition into culture medium, or the culture medium component went, or a front face, is increased and grown up or is called a matrix or a SUKYA hold, a scaffold, support, mold, etc., and you increase and they are making it grow up.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] By the way, it is important for a cell, growth of an organization, and growth to give the cell which should be cultivated, and an organization physical irritation in addition to environmental conditions, such as temperature, humidity, carbon dioxide levels, and an oxygen density. In order to grow up a cell, the cell near an organization, and an organization more in the living body, such physical irritation is an indispensable element while promoting differentiation and growth of a cell and an organization. There is patent No. 3163533 "the flexible stimulus load equipment for cultured cells using a silicon belt" as a technique which gives physical irritation to a cell, growth of an organization, and growth.

[0004] And although it is required for the static conditions of culture environments, such as temperature, humidity, carbon dioxide levels, and an oxygen density, to weight the dynamic conditions of physical irritation, controlling dynamic conditions with static conditions has a possibility of making cause elements, such as invasion of saprophytic bacteria, increasing in a cell, growth of an organization, and growth while a control gestalt is complicated. It is an important technical problem to protect a culture-ed from saprophytic-bacteria contamination.

[0005] Then, by making a desired tensile stress into physical irritation, this invention is given to cultures-ed, such as a cell and an organization, and makes it a technical problem to offer the cell and tissue culture equipment which can aim at the promotion of culture.

[0006]

[Means for Solving the Problem] The chamber which the cell and tissue culture equipment of this invention make circulate through culture medium (24) (culture chamber 8), The culture-ed which is installed in this chamber and cultivated (a matrix 32, culture objects 32A and 32B), A stress generating means to make a tensile stress act on this culture-ed from from outside said chamber (electromagnetism a stretcher 38, an actuator 56), While making intermittent the tensile stress which is equipped with the control means (control units 50 and 60) made to increase gradually or dwindle the magnitude of intermittence and said tensile stress for said tensile stress generated for this stress generating means, and is applied to said culture-ed It is characterized by making it possible to increase gradually or dwindle the stress with the passage of time.

[0007] That is, the tensile stress which generated the stress generating means is applied to the culture-ed installed in the chamber from the outside of a chamber. And the gestalt of the stress is controlled by the control means by intermittence, gradual increase, or the gradual decrease condition. Consequently, a culture-ed is expanded and contracted by being shrunken at the time of discharge of elongation and a tensile stress at the time of impression of a tensile stress. For example, since the end side of a culture-ed can be fixed in a chamber, a culture-ed can be made to expand and contract by making tension act on that other end side at discontinuity, and the tensile stress according to this telescopic motion and the magnitude of that tension, intermittence, etc. is given to a culture-ed,

consequently physical irritation required for growth is given to a culture-ed, culture creation of the tough organizations, such as a ligament, can be carried out. In this case, the generating means of mechanical power, such as cylinder equipment, can be used for the generating means of a tensile stress.

[0008] The chamber which the cell and tissue culture equipment of this invention make circulate through culture medium (24) (culture chamber 8), The elasticity member installed in this chamber with a culture-ed (a matrix 32, culture objects 32A and 32B) (culture sheet 22), A stress generating means to make a tensile stress act on said culture-ed from from outside said chamber through this elasticity member (electromagnetism a stretcher 38, an actuator 56), While making intermittent the tensile stress which is equipped with the control means (control units 50 and 60) made to increase gradually or dwindle the magnitude of intermittence and said tensile stress for said tensile stress generated for this stress generating means, and is applied to said culture-ed It is characterized by making it possible to increase gradually or dwindle the stress with the passage of time.

[0009] By the way, it is important for making tension act on a culture-ed directly to prevent damage and plasmotomy fully in consideration of growth of a culture-ed. Then, if a culture-ed is made to adhere to an elasticity member, a culture-ed will be protected by the elasticity member and telescopic motion of it will be attained with an elasticity member. If the stress which the stress generating means generated is applied and it is made to expand and contract to such an elasticity member, the tensile stress according to the telescopic motion can be made to act on a culture-ed. If this tensile stress is made to act and a culture-ed is cultivated, the cells and organizations which have received the tensile stress continuously, such as a tendon and a ligament, are realizable. For example, the end side of the elasticity member which planted the culture-ed in the chamber can be fixed, it can be made to be able to expand and contract by making tension act on that other end side at discontinuity, and the tensile stress according to this telescopic motion and the magnitude of that tension, intermittence, etc. can be given to a culture-ed.

[0010] In the cell and tissue culture equipment of this invention, said stress generating means (electromagnetism stretcher 38) is characterized by constituting from an electromagnetic-force generator which makes magnetism act on the magnetic substance (30) attached in said culture-ed or said elasticity member. That is, if electromagnetic force is made to act on the magnetic substance attached in the culture-ed or the elasticity member, electromagnetic force can give a tensile stress required for the culture-ed in a chamber from the outside of a chamber to a culture-ed or an elasticity member. In this case, since a tensile stress can be given to a culture-ed non-contact and indirectly from the exterior of a chamber, a culture-ed can be protected from contamination of saprophytic bacteria etc.

[0011] In the cell and tissue culture equipment of this invention, it is characterized by using the silicone rubber sheet for said elasticity member. That is, a silicone rubber sheet does not pollute a culture-ed while equipping a culture-ed with elasticity required to give a tensile stress as physical irritation.

[0012] In the cell and tissue culture equipment of this invention, the culture unit (2) in which said chamber was formed is characterized by the removable thing in the culture circuit (circuit 23) which circulates said culture medium. That is, since the sealing-ization becomes easy while a culture-ed is transportable with a culture unit, a culture-ed can be protected from contamination of saprophytic bacteria etc.

[0013] In the cell and tissue culture equipment of this invention, while carrying out the rarefaction of a part or all of said culture unit in which said chamber was formed, it is characterized by enabling the outside of said chamber to photography of said culture-ed in said chamber by having a photography means (CCD camera 522). That is, a culture condition can be supervised easily, without being able to photo the culture-ed under culture and disturbing the culture environment in a chamber. The

photography or image data serves as data with important growth of a culture-ed and growth.

[0014] In the cell and tissue culture equipment of this invention, said culture-ed is characterized by being formed the shape of a sheet, tubed, or in the shape of a column. That is, a culture-ed is cultivated the shape of a sheet, tubed, or in the shape of a column as a gestalt corresponding to the part of the bodies which should be restored, such as a ligament.

[0015] In the cell and tissue culture equipment of this invention, said culture-ed is characterized by having knit the organism of the shape of fibrous or a string, and having elasticity. That is, by knitting the organism which consists of a collagen formed the organism of the shape of fibrous or a string, for example, fibrous, and in the shape of a string, the suitable elasticity and the tough nature for an organism before growth can be made to be able to hold, and tough organizations, such as a ligament, can be cultivated.

[0016]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the gestalt of operation of this invention is explained to a detail with reference to an example.

[0017] drawing 1 thru/or drawing 6 -- the 1st example of the cell and tissue culture equipment of this invention -- being shown -- drawing 1 -- in the configuration of a culture unit and a mechanical component, and drawing 2 , a culture sheet and drawing 5 show a control unit, and, as for the II-II line cross section of drawing 1 , and drawing 3 , drawing 6 shows the culture environment, as for the configuration of a culture unit, and drawing 4 .

[0018] The culture unit 2 which forms the culture space which cultivates the culture-ed which are cells and organizations of a living body, such as people, is formed in this cell and tissue culture equipment. This culture unit 2 is formed by the resin ingredient metallurgy group ingredient with which matter which has a bad influence on a living body with high thermal resistance is not eluted, for example, fluororesin, PEEK, high heatproof grade polypropylene, silicone, stainless steel, etc.

[0019] This culture unit 2 is equipped with the container section 4 and the removable covering device 6, and the culture chamber 8 is formed in the interior of the container section 4 sealed by the covering device 6 as blockaded culture space. While the covering device 6 is being fixed to the container section 4 removable with two or more securing bolts 10 in the case of this example, between the container section 4 and a covering device 6, O ring 12 of the rectangle which surrounds the culture chamber 8 is inserted, and sufficient airtightness for the culture chamber 8 is held. In order that the container section 4 may enable a check of an internal culture condition, it may form a transparence part or may constitute it from a transparence member.

[0020] The culture sheet 22 which consists of a silicone rubber sheet etc. as an elasticity member whose culture chamber 8 the rectangle section 16 is formed inside at its circular section 14 and opening side, the port sections 18 and 20 for circulation are formed in the diameter direction of the circular section 14 at the wall of the container section 4 at the circular section 14 side, and is a culture floor at the rectangle section 16 side is installed. The draft tube 25 of the circuit 23 which is a culture circuit is connected, and while the culture medium 24 supplied through a circuit 23 circulates through the inside of the culture chamber 8, it is accumulated in the port sections 18 and 20 for circulation.

[0021] The culture sheet 22 is narrower than the rectangle section 16 of the culture chamber 8, it is a short rectangle configuration, two or more bores 26 are formed crosswise [ of the culture sheet 22 ] at fixed spacing at the end side, and two or more stop projected parts 28 which are the fixed means formed in the rectangle section 16 side of the culture chamber 8 are inserted in each bore 26. The end of the culture sheet 22 is being fixed to the interior of the culture chamber 8 by engagement to this stop projected part 28 and bore 26. A prismatic form is sufficient although the stop projected part 28 is formed in the shape of a cylinder in this example. And the prismatic form magnetic substance 30 is attached in the other end of this culture sheet 22, i.e., that free one end, and as shown in drawing 4 ,

the matrix 32 formed by collagen sponge etc. between the magnetic substance 30 and a bore 26 is attached in the front face of the culture sheet 22. The ligament cell this matrix 32 of whose is a culture-ed and which people should cultivate, tendon cells, a muscular cell, etc. are planted.

[0022] And it is unified and the container section 4 and the covering device 6 of this culture unit 2 are attached in the base 34 removable with the securing bolt 36. moreover, the electromagnetism which makes a base 34 generate stress according to electromagnetic force as a stress generating means -- the stretcher 38 is attached with the securing bolt 40. A securing bolt 42 is a means for fixing to the pedestal which does not illustrate a base 34. In addition, in order that a base 34 may enable a check of the culture condition inside the container section 4, it may form a transparency part corresponding to the culture chamber 8, or may constitute it from a transparency member.

[0023] electromagnetism -- a stretcher 38 is a stress generating means by the electromagnetic force which wound the solenoid 46 around the core 44 formed by the ferrite etc., and makes the end of a core 44 have countered the magnetic substance 30 in the culture chamber 8 this electromagnetism -- the control unit 50 is connected to the solenoid 46 of a stretcher 38 considering the drive current as a control means which performs a sink, its discharge, etc.

[0024] Thus, if are constituted, and a solenoid 46 will be excited and electromagnetic force will be made to act on the magnetic substance 30 through a core 44, it is drawn by the magnetic substance 30 to a core 44 side, and tension can be made to act so that the matrix 32 which is the cell and organization which are increased within collagen sponge with the culture sheet 22 may be extended. If the electromagnetic force is canceled, the culture sheet 22 will be shrunk by the elasticity. Consequently, the tensile stress by telescopic motion and its return force of the culture sheet 22 can be made to act on a matrix 32. At this time, liquid sending of the culture medium 24 required for culture and circulation are performed through a circuit 23, and growth of a cell or an organization is promoted.

[0025] and it is shown in a control device 50 at drawing 5 -- as -- electromagnetism -- while passing a drive current to the solenoid 46 of a stretcher 38, the main control section 501 which performs drive control besides the current control section 500 which performs that control, and control of this current control section 500, a display control, etc. is formed, and program control for setting up a tension pattern etc. is performed. The main control section 501 is equipped with CPU as a processing means, ROM, RAM as memory, etc., and a program setup of rotation conditions etc. is performed in it from the input unit 502 connected outside. Moreover, external storage 512 and database 514 grade are prepared in the main control section 501 as a display 504, the driving switch 506 which gives train operation dispatching, and a means to memorize various data besides a pilot light 508 and the warning buzzer 510 which is an alarm means as an operation display means. moreover, the temperature sensor 518 which the safety device 516 which prevents abnormality actuation is formed in this control unit 50, and this safety device 516 is put side by side to a solenoid 46, and detects the temperature rise of a solenoid 46 and the main control section 501 which prevents abnormality actuation as a detection means of an excessive current which flows to a solenoid 46 with the detection output of the current control section 500, these temperature rises, or an excessive current -- with, it is constituted.

[0026] Moreover, this cell and tissue culture equipment are held in the culture warehouse 550 which is constituted as shown in drawing 6 , and forms the optimal culture environment. The liquid-sending equipment 556 for performing circulation of the culture medium bag 552 which collects culture medium 24, the gas absorption tube 554 which makes gas absorb to a circuit 23, and culture medium 24 is formed in the circuit 23. When the piston 562 which moves with the piston driving gear 560 is formed in liquid-sending equipment 556, a piston 562 marches out, open retreats [ a valve 564 ] and close and a piston 562 retreat [ a valve 566 ], a valve 564 serves as close, a valve 566 serves as open, and sending out of the culture medium 24 of the specified quantity is performed.

[0027] And the culture warehouse 550 is N2 while having humidification equipment 576 and a temperature sensor 578 as a means to set up a fan 574 and desired humidity as a heater 572 and a ventilation means as a heating means. A feeder 580 to N2, and O2 A feeder 582 to O2 and CO2 A feeder 584 to CO2 It is supplied and the cell and the optimal culture environment for growth and growth of an organization are formed.

[0028] Next, it explains with reference to the flow chart which shows the culture processing using the cell and tissue culture equipment of the 1st example to drawing 7 and drawing 8 . In drawing 7 and drawing 8 , A and B show the connector between flow charts.

[0029] After removing a covering device 6 and holding the matrix 32 which planted the cell and the organization in the culture chamber 8 in actual culture, it installs in the culture warehouse 550. After setting the temperature in the culture warehouse 550, humidity, a diacid-ized oxygen density, an oxygen density, etc. as suitable conditions, the culture medium 24 of the optimal flow rate for a cell and an organization is supplied to a matrix 32.

[0030] At step S1, while setting a control unit 50 as operating state and inputting an operation program through an input unit 502, conditioning is performed. For example, as for an input item, step [ 1st ] - the 3rd step is set up supposing a culture phase etc. In the 1st step, S1 and its duration for physical irritation, i.e., the level of a tensile stress, T1, the 2nd step -- the level of a tensile stress -- S2 and its duration -- T2 and the 3rd step -- the level of a tensile stress -- S3 and its duration -- T3 then, these size relation -- S1 -- < -- S2 -- < -- S3 and T1 < T2 < T3 \*\* -- it carries out. This condition is an example and can set up various conditions.

[0031] After such conditioning, if a driving switch 506 is supplied at step S2, while shifting to step S3 and performing an operation display to a display 504, a display lamp 508 lights up.

[0032] And at step S4, it is level S1 to the culture sheet 22. In order to make a tensile stress act, it is level S1 to a solenoid 46. A corresponding current is added and it shifts to step S5. At step S5, in order to maintain the precision of a tensile stress, it judges whether abnormalities have arisen in the safety device 516. In this case, the value of the detection current which flows to a solenoid 46 judges whether it is abnormality level, and the detection temperature of a solenoid 46 judges whether it is abnormal temperature, and in being normal, it shifts to step S6. At step S6, it is time amount T1. It is judged and it is duration T1 whether it passed or not. Step S4 and processing of S5 are performed until it passes.

[0033] Time amount T1 If it passes, it shifts to step S7, and the current which is equivalent to level S2 at a solenoid 46 will be impressed, and it will shift to step S8. At step S8, it judges whether abnormalities are in a safety device 516, and in being normal, it shifts to step S9. At step S9, it is time amount T2. It is judged and it is duration T2 whether it passed or not. Processing of steps S7 and S8 is performed until it passes.

[0034] Time amount T2 When it passes, it shifts to step S10 and is level S3 to a solenoid 46. A corresponding current is impressed and it shifts to step S11. At step S11, it judges whether abnormalities are in a safety device 516, and in being normal, it shifts to step S12. At step S12, it is time amount T3. It is judged and it is duration T3 whether it passed or not. Processing of steps S10 and S11 is performed until it passes.

[0035] Time amount T3 Processing of steps S10-S13 is performed until it shifts to step S14, and judges whether the driving switch 506 was turned off and shifts to OFF, after shifting to step S13 and performing a termination display, if it passed.

[0036] If a driving switch 506 is turned off, it will shift to step S15, discharge of an excitation halt of a solenoid 46, an operation display, and a termination display will be performed, and a culture program will be completed.

[0037] Moreover, when abnormalities become clear to a safety device 516 at step S5, step S8, or step

S11, while shifting to step S16 and suspending the current supply source to a solenoid 46, it shifts to step S17, and while displaying an alarm display on a display 504, singing of the warning buzzer 510 is carried out, and it notifies of abnormalities.

[0038] next, drawing 9 thru/or drawing 14 -- the 2nd example of the cell and tissue culture equipment of this invention -- being shown -- drawing 9 -- as for X-X-ray cross section of drawing 9 , and drawing 11 , a culture sheet and drawing 13 show a culture unit, drawing 14 shows the configuration of a control unit, and the XI-XI line cross section of drawing 9 and drawing 12 have given [ the configuration of a culture unit and a mechanical component, and drawing 10 ] the same sign to the same part as the 1st example.

[0039] The cell and tissue culture equipment of this example are replaced with the solenoid 46 of the 1st example, and it is made to make direct stress act on the culture sheet 22 and a matrix 32 from the exterior of the culture chamber 8. In this case, the tension spindle 52 attached in the culture sheet 22 from the bore 51 formed in the side-attachment-wall side of the culture unit 2 is pulled out, and the driving shaft 58 of the actuator 56 which is a stress generating means is attached in the end of this tension spindle 52 through the spring 54 for tension control. The control unit 60 is connected to the actuator 56 as a control means which controls the attitude of a driving shaft 58.

[0040] As shown in drawing 12 , a chuck 62 is attached as a fixed means, the culture sheet 22 is held tabular, the tension spindle 52 is attached in the tooth-back side of a chuck 62, and the bore 64 for attaching the spring 54 for tension control is formed in this tension spindle 52 at free one end of the culture sheet 22.

[0041] And O ring 66 is attached in the bore 51 formed in the side-attachment-wall section of the container section 4 of the culture unit 2 as an airtight maintenance means of the tension spindle 52 and the culture unit 2, and the lock out plate 68 is attached in the lateral portion of the culture unit 2 as a means to hold this O ring 66 to the culture unit 2 side. The culture unit 2 is attached in a pedestal 70 removable with a securing bolt 36, and the control unit 60 is formed in the actuator 56 as a means to perform drive control of an actuator 56, growth, the monitor of growth, etc.

[0042] This control unit 60 is constituted as shown in drawing 14 . That is, drive control of the actuators 56, such as a cylinder which performs impression and its discharge of a tensile stress on the culture sheet 22 by moving, is performed, and also the main control section 600 which performs a display control etc. is formed, and program control for setting up a tension pattern etc. is performed. The main control section 600 is equipped with CPU as a processing means, ROM, RAM as memory, etc., and a program setup of rotation conditions etc. is performed in it from the input unit 602 connected outside. Moreover, external storage 612 and database 614 grade are prepared in the main control section 600 as a display 604, the driving switch 606 which gives train operation dispatching, and a means to memorize various data besides a pilot light 608 and the warning buzzer 610 which is an alarm means as an operation display means. Moreover, the safety device 616 which prevents the abnormality actuation is put side by side to the actuator 56.

[0043] If tension can be made to act so that the matrix 32 which is the cell and the organization which are increased within collagen sponge with the culture sheet 22 may be extended, if an actuator 56 is driven and tension is made to act on the tension spindle 52 and that drive is canceled, the culture sheet 22 can make the tensile stress by telescopic motion and its return force of the culture sheet 22 act on a matrix 32 in this 2nd example, as a result of being shrunk by that elasticity. And liquid sending of the culture medium 24 required for culture and circulation are performed through a circuit 23, and growth of a cell or an organization is promoted like the 1st example.

[0044] Next, it explains with reference to the timing chart which shows the culture processing using the cell and tissue culture equipment of the 2nd example to the flow chart shown in drawing 15 and drawing 16 , and drawing 17 . In drawing 15 and drawing 16 , C and D show the connector between



flow charts.

[0045] Also in the 2nd example, after removing a covering device 6 and holding the matrix 32 which planted the cell and the organization in the culture chamber 8 in actual culture, it installs in the culture warehouse 550. After setting the temperature in the culture warehouse 550, humidity, a diacid-ized oxygen density, an oxygen density, etc. as suitable conditions, it is the same as that of the 1st example to supply the culture medium 24 of the optimal flow rate for a cell and an organization to a matrix 32.

[0046] At step S21, while setting a control unit 60 as operating state and inputting an operation program through an input unit 602, conditioning is performed. For example, as for an input item, step [ 1st ] - the 3rd step is set up supposing a culture phase etc. The 1st step is duration T1. It carries out. Physical irritation F1 (this example  $F1 = 0$ ), i.e., tension The 2nd step is duration T2. Carrying out, tension F2, loading time tA2, the no-load time amount tS2, and the 3rd step are duration T3. It carries out and tension F3, loading time tA3, and the no-load time amount tS3 are set up. These size relation is  $F1 \leq 0$   $F2 < F3$  and  $T1 < T2 < T3$ . Although carried out, this condition is an example and can set up various conditions.

[0047] After such conditioning, if a driving switch 606 is supplied at step S22, it shifts to step S23, and as shown in (A) of drawing 17 , while an operation display is performed, a display lamp 608 will light up to a display 604.

[0048] And at step S24, it is time amount T1. It judges whether it passed or not and is time amount T1. After passing, it shifts to step S25 and judges whether abnormalities arose in the safety device 616, and in being normal, it shifts to step S26. At step S26, it is tension F2. Only the phase present moves an actuator 56.

[0049] At step S27, it judges whether this loading time tA2 passed. That is, only loading time tA2 is tension F2. If impression is maintained and loading time tA2 passes, after shifting to step S28 and returning an actuator 56 to a zero, it shifts to step S29.

[0050] At step S29, when it judges whether the no-load time amount tS2 passed and the no-load time amount tS2 passes, it shifts to step S30. At step S30, it is duration T2. It is judged and it is duration T2 whether it passed or not. As shown in (C) of drawing 17 , processing of steps S25-S29 is continuously performed, until it passes.

[0051] Time amount T2 If it passes, it shifts to step S31, it judges whether abnormalities arose in the safety device 616, and in being normal, it will shift to step S32. At step S32, it is tension F3. Only the phase present moves an actuator 56 and shifts to step S33.

[0052] It is tension F3 until it is judged whether loading time tA3 passed at step S33 and loading time tA3 passes. The condition of having made it acting is maintained.

[0053] If loading time tA3 passes, it shifts to step S34, and an actuator 56 will be returned to a zero, and it will shift to step S35, and will judge whether the no-load time amount tS3 passed.

[0054] When the no-load time amount tS3 passes, it shifts to step S36 and is duration T3 at step S36. It is judged and it is duration T3 whether it passed or not. As shown in (C) of drawing 17 , processing of steps S31-S35 is continuously performed, until it passes.

[0055] Time amount T3 If it passed, after shifting to step S37 and performing a termination display, it shifts to step S38, and as it is shown in (B) of drawing 17 whether the driving switch 606 was turned off until it judges and shifts to OFF, a termination display lights up.

[0056] If a driving switch 606 is turned off, it will shift to step S39, discharge of a drive halt of an actuator 56, an operation display, and a termination display will be performed, and a culture program will be completed.

[0057] Moreover, while displaying the purport which shifted to step S41 and abnormalities produced in the display 604 while shifting to step S40 and stopping the drive of an actuator 56, when

abnormalities become clear to a safety device 616 at step S25 or step S31, singing of the warning buzzer 610 is carried out, and it notifies of abnormalities.

[0058] Such processing can give the physical irritation by different tension according to a culture phase to a culture-ed like the 1st example. Although the muscles of the body, the tendon, the cartilage of a joint, the bone, the ligament, etc. have received the physical irritation which changes with movements continuously, by using the cell and tissue culture equipment of the 2nd example, they can realize the same physical irritation as the body, and can cultivate tough cell and organization. Especially, in the 2nd example, tension is changing with acceleration and moderation and the cell and the organization under culture have realized broad physical irritation from a pulse-stimulus to a loose stimulus.

[0059] Next, drawing 18 shows attachment and detachment of the culture unit 2. After culture is completed using the culture unit 2 shown in the 1st example or the 2nd example, the culture unit 2 The draft tube 25 of the circuit 23 connected to the port sections 18 and 20 for circulation is blockaded. For example, in this example If the culture unit 2 is straddled, a pinch cock 100 and the cock bulb 102 are attached in a draft tube 25 as a closedown means and closedown processing of these pinch cocks 100 and the cock bulb 102 is performed While the culture unit 2 is separable from a circuit 23, the culture chamber 8 can be held in the sealing condition, and culture medium 24 is not made to reveal.

[0060] Moreover, if the culture unit 2 is sterilized by the sterilization approaches, such as an autoclave, ultraviolet disinfection, gamma ray sterilization, etc., the interior can maintain an aseptic condition over a long period of time. Although the pinch cock 100 and the cock bulb 102 are used as a means to stop a draft tube 25, in this example, other closedown means may be used.

[0061] Next, drawing 19 shows the 3rd example of the cell and tissue culture equipment of this invention. In this example, the fluoroscopy wall 520 which can see through the inside of the culture chamber 8 to a part or all of the culture unit 2 of the 1st example is formed in a base 34 and the container section 4. CCD camera 522 as a photography means to photo the matrix 32 in the culture chamber 8 near this fluoroscopy wall 520 is installed. While the image acquired with this CCD camera 522 is added and processed by the image processor 524 and is displayed on a graphic display device 526, it is added to judgment equipment 528 as judgment information. With judgment equipment 528, the judgment of the existence of growth, a growth condition, and saprophytic bacteria growth (contamination) is performed by discoloration, a configuration, etc. of a matrix 32 from the image, and the judgment result is added to the main control section 501. namely, -- if the situation of the matrix 32 in the culture chamber 8 is regarded as image information and it observes through the image information -- growth, growth situation, and growth step of a matrix 32 -- vision -- with, it can grasp exactly and the exact measures according to the situation can be taken. The monitor by the fluoroscopy in such a culture unit 2 is applicable similarly in the cell and tissue culture equipment of the 2nd example.

[0062] Next, drawing 20 - drawing 23 show other examples of a culture-ed. In the 1st example and the 2nd example, as shown in (A) of drawing 20 , while attaching the magnetic substance 30 in a matrix 32, as the bore 26 for immobilization may be formed and it is shown in (B) of drawing 20 , a chuck 62 and TENSION SUPPLY 52 may be attached in a matrix 32, and it is not necessary to necessarily use the culture sheet 22 for a culture-ed, although considered as the culture floor using the culture sheet 22.

[0063] Moreover, as shown in (A) of drawing 21 , culture object 32A with the flexibility which knit the organism of the shape of fibrous or a string which consists of a collagen etc. as a culture-ed like rib stitch \*\* or stockinet, and formed it may be used. A bore 26 is formed in the fixed-end side of this culture object 32A, the chuck 62 equipped with the tension spindle 52 is attached in that free one end, and it may be made to perform tension grant and discharge similarly. Also in the culture which does

not use such a culture sheet 22, as shown in (B) of drawing 21, sheet-like a culture-ed is realizable. Moreover, it replaces with a chuck 62 and the tension spindle 52, and the magnetic substance 30 is attached in free one end of culture object 32A, and magnetism is made to act on this magnetic substance 30, and you may make it give a tensile stress to culture object 32A like the 1st example.

[0064] Moreover, as shown in (A) of drawing 22, and (B), the organism of the shape of fibrous or a string which consists of a collagen etc. as a culture-ed is knit to plate-like, and culture object 32B with the flexibility which involved it in tubed or in the shape of a column, and formed it may be used. in this case, the fixed part 72 which projected that end side in the wall section of the culture unit 2 -- fixing -- that free one end -- the magnetic substance 30 -- attaching -- electromagnetism -- if tension grant and its discharge are repeated using a stretcher 38 and the physical irritation corresponding to the momentum of the body is given, the culture-ed of the shape of tubed or a column can be obtained. Moreover, when such tubed culture object 32B is used, it may be filled up with collagen sponge etc. as a matrix 32 in the centrum.

[0065] Moreover, when culture object 32B with the flexibility which involved it in tubed or in the shape of a column, and formed it is used, as it knits the organism of the shape of fibrous or a string which consists of a collagen etc. as a culture-ed to plate-like, and it is shown in (A) of drawing 23 As it fixes using the fastener 74 which projected the end side in the wall section of the culture unit 2, the tension spindle 52 is attached in the free one end and it is shown in drawing 9 and drawing 10 If tension grant and its discharge may be repeated to culture object 32B using an actuator 56, the physical irritation corresponding to the momentum of the body may be given and it does in this way, the culture-ed of the shape of tubed [ which is shown in (B) of drawing 23 ] or a column can be obtained. And it may be filled up with collagen sponge etc. as a matrix 32 in the centrum of tubed culture object 32B like said example.

[0066] In addition, although the 1st example explained the case where control by the flow chart shown in a cell and tissue culture equipment at drawing 7 and drawing 8 was performed May use the control shown in the equipment of the 1st example at drawing 15 - drawing 17, and it sets to the equipment of the 1st example. For example, the 1st step is duration T1. It carries out. Physical irritation F1 (this example  $F_1 = 0$ ), i.e., tension The 2nd step is duration T2. Carrying out, tension F2, loading time tA2, the no-load time amount tS2, and the 3rd step are duration T3. It carries out and is set as tension F3, loading time tA3, and the no-load time amount tS3, and the same effectiveness is expectable even if it gives tension change intermittently.

[0067]

[Effect of the Invention] According to this invention, the following effectiveness is acquired as explained above.

Physical irritation, such as a tensile stress, can be given to the culture-ed in a chamber by non-contact. For example, the cell on living bodies which have received the tensile stress continuously, such as a tendon and a ligament, and culture of an organization can be performed.

b Physical irritation, such as a tensile stress according to a growth step, can be given to a culture-ed.

c It can become independent of a culture circuit, the culture unit which holds a culture-ed can be separated, detached, attached and moved, and a culture-ed can be protected from contamination of saprophytic bacteria etc.

d Desired physical irritation can be given to a culture-ed and promotion of culture can be aimed at with implementation of the physical irritation corresponding to the part on a living body.

e a cell and the growth step of an organization -- an image -- with, it can grasp exactly.